

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. März 2004 (11.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/020990 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 27/40,
C12Q 1/00

Str. 3, 35394 Giessen (DE). JUSTUS-LIEBIG-UNI-
VERSITÄT GIESSEN [DE/DE]; Ludwigstr. 23, 35390
Giessen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/002777

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. August 2003 (19.08.2003)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HANSTEIN, Stefan,
Martin [DE/DE]; Bornhöll 18, 35457 Lollar (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(74) Gemeinsamer Vertreter: TRANSMIT
GESELLSCHAFT FÜR TECHNOLOGIETRANS-
FER MBH; Kerkrader Str. 3, 35394 Giessen (DE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 39 264.1 22. August 2002 (22.08.2002) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, BR, CA, CN, IN, JP,
KR, LT, LV, MX, NO, PL, US, ZA.

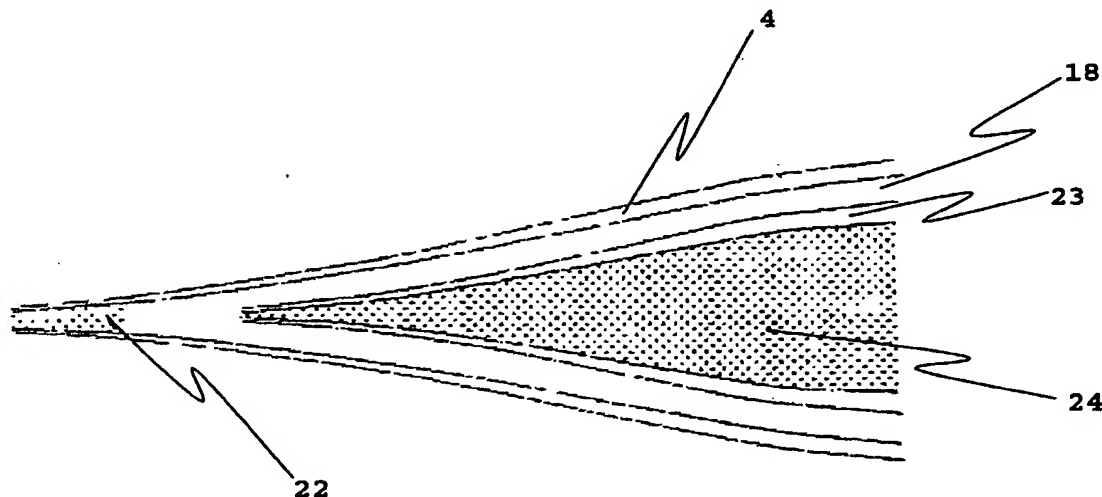
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): TRANSMIT GESELLSCHAFT FÜR TECH-
NOLOGIETRANSFER MBH [DE/DE]; Kerkrader

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: SILICON SEAL FOR MICROPROBES

(54) Bezeichnung: SILIKON-DICHTUNG FÜR MIKROSONDEN



(57) Abstract: The invention relates to silicon seals for measuring gas concentrations, to methods for producing these seals and to methods for producing microprobes while using these seals. Said seals have a high permeability to analytes, are electrically non-conductive and can be implemented in microprobes. The inventive microprobes are particularly suited for conducting phytophysiological measurements and can, for example, be used for conducting the high resolution measurement of gases at individual stomata of plant leaves.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Silikon-Dichtungen zur Messung von Gaskonzentrationen, Verfahren zur Herstellung dieser Dichtungen und Verfahren zur Herstellung von Mikrosonden unter Verwendung dieser Dichtungen. Die Dichtungen weisen eine hohe Permeabilität für den Analyten auf, sind elektrisch isolierend und können in Mikrosonden realisiert werden. Die erfindungsgemässen Mikrosonden sind besonders geeignet für phytophysiologische Messungen und können beispielsweise für die hoch auflösende Messung von Gasen an einzelnen Stomata von Pflanzenblättern verwendet werden.



WO 2004/020990 A1



Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Patentanmeldung

Silikon-Dichtung für Mikrosonden

5 Der qualitative und quantitative Nachweis von Gasen sowie in
Flüssigkeiten gelösten Gasen und Ionen spielt in Wissenschaft
und Technik eine große Rolle. Die derzeit realisierten Sonden
und Sensoren erlauben die Bestimmung von Gasen, Ionen oder
aus gasförmigen Stoffen gebildeten Ionen beispielsweise in
10 Verbrennungsanlagen, bei der Kontrolle von Abgasen und in
zahlreichen biologischen Systemen. Dabei kommen verschiedene
Messverfahren für die Substanzbestimmung zum Einsatz, wobei
die Verwendung eines bestimmten Analyseverfahrens von Charak-
ter und voraussichtlicher Konzentration des zu bestimmenden
15 Stoffes und dem Einsatz- bzw. Messort (Makro- oder Mikromaß-
stab) abhängt.

Zur Detektion geeignet sind solche physikalischen und / oder
chemischen Eigenschaften des Analyten, die eindeutige Rück-
schlüsse auf seine Natur zulassen und die sich proportional
20 zu seiner Konzentration verändern. Zu den eingesetzten Mess-
verfahren zählen potentiometrische und amperometrische Ver-
fahren sowie Messungen von Leitfähigkeit, Temperatur, Druck
bzw. Partialdruck, Resonanzfrequenz und magnetischer Suszep-
tibilität. Je nach Messanordnung und Natur des Analyten und
25 der Messeinrichtung kann die Änderung der Eigenschaften des
Analyten (Primärsubstanz) direkt bestimmt werden, oder der
Analyt wird in eine Sekundärsubstanz überführt, welche dann
gemessen wird. Im letztgenannten Fall müssen Primär- und
Sekundärsubstanz in einem definierten mathematischen Verhält-
30 nis zueinander stehen.

Um Analyten auch in Substanzgemischen bestimmen zu können,
werden häufig Messapparaturen eingesetzt, bei denen der
eigentliche Messbereich durch eine semipermeable Membran vom
zu untersuchenden Gemisch getrennt ist. Im Idealfall kann

diese Membran nur von einem oder wenigen der zu analysierenden Stoffe passiert werden. Diese Membran kann beispielsweise aus Glas, Kunststoffen / Polymeren oder metallischen Verbindungen bestehen. Silikonmembranen sind seit langem im Einsatz
5 in Messsonden für Kohlendioxid und Sauerstoff. Der hohe elektrische Widerstand von Silikonen gewährleistet bei Benutzung in leitenden Medien, dass das elektrische Potenzial der Messlösung nicht den Sensorstromkreis beeinflusst.

10

Beschreibung und Stand der Technik

Derzeit sind verschiedene Elektroden und Sensoren bekannt, mit denen gasförmige Stoffe oder in Flüssigkeit gelöste Gase
15 und Ionen bestimmt werden können. Dabei werden verschiedene chemische und physikalische Parameter genutzt, um die zu bestimmenden Analyten ggf. auch in Substanzgemischen zu identifizieren. Viele Messmethoden bedienen sich verschiedener Elektroden aus Edelmetallen und ihren Salzen. Das Salz
20 kann dabei je nach Ausführung der Elektrode in gelöster oder fester Form vorliegen. Die Detektion des Analyten kann beispielsweise durch amperometrische oder potentiometrische Messung erfolgen. Nachteilig für die Messung sehr kleiner oder sich rasch ändernder Analytkonzentrationen sind die
25 meist zu hohe Nachweisgrenze des Sensors, eine zu geringe Selektivität für einen bestimmten Analyten in einem Gemisch sowie der Zeitbedarf bis zum Erhalt des Messsignals.

Allen Messanordnungen ist gemein, dass sich zwischen dem Messmedium und dem Detektionssystem eine semipermeable Membran befindet, die nur für den Analyten oder das Gemisch der
30 zu analysierenden Substanzen durchlässig ist, um auf diese Weise die Selektivität der Messung zu erhöhen.

Die DE 19921532 A1, DE 96402705 T2, DE 69031901 T2, DE 19914628 A1 und WO 97/46853 beschreiben Sensoren, die Gase

amperometrisch, potentiometrisch oder über Partialdruck, Temperatur, elektrische und Wärmeleitfähigkeit bzw. Adsorption bestimmen. Sauerstoff lässt sich nach DE 3541341 C2 durch Messung der O₂-abhängigen Änderung der magnetischen Suszepti-
5 bilität messen. Die DE 19602861 C2 beschreibt einen Sauerstoffsensor, der aus einer Dialysemembran, einer Silber-Silberchlorid-Anode und einer Kathode aus Silber oder Platin besteht. Die Membran wird aus einem Gel hergestellt, das sowohl ein Salz als auch ein Enzym enthält. Im Gegensatz zur
10 vorliegenden Erfindung handelt es sich nicht um ein elektrisch isolierendes Polymer.

Es existieren zahlreiche Veröffentlichungen zur Messung von Ionen in biologischen Proben: Die DE 4013665 C2 beschreibt Schwingquarzsensoren, deren Resonanzfrequenz von der Analyt-
15 konzentration in der Probenflüssigkeit abhängt, wobei Störungen des Stoffwechsels biologischer Proben nicht auszuschließen sind. In DE 69415644 T2 ist eine chloridsensitive Elektrode mit einer Silikonmembran zur Messung von Chloridionen beschrieben. Eine Bakterien enthaltende Mikrosonde zur Be-
20 stimmung von Nitrat ist in WO 99/45376 erläutert. Die DE 3813709 A1 und DE 69514427 T2 beschreiben Elektroden zur Messung von Substanzen in Körperflüssigkeiten, die eine Polymerschicht mit aktiven Enzymen enthalten. In DE 10018750 A1 wird eine Elektrode beschrieben, die aus einer intrinsisch
25 leitfähigen, polymeren Kontaktschicht und einer ionenselektiven Glasmembran bestehen.

Alle genannten Elektroden und Sensoren sind jedoch nicht für die Messung kleinster Konzentrationen oder Volumina in biologischen Proben geeignet.

30

Das Messprinzip vieler Sensoren beruht auf einer stöchiometrischen Umsetzung eines Primäranalyten zu einem Sekundäranalyten. In vielen Fällen enthält die Messanordnung einen Stromkreis, der auf die Konzentration bzw. Aktivität des

Sekundäranalyten reagiert und ein von dessen Konzentration abhängiges Messsignal liefert. Bei potentiometrischen Sonden, die auf Grund der erforderlichen Messempfindlichkeit Messsignale in der Größenordnung von 50 μ V erkennen müssen, muss der

5 Stromkreis des Sensors von der Probe elektrisch isoliert sein, damit das elektrische Potenzial der Probenflüssigkeit nicht das Messergebnis verfälscht. Vorteilhaft ist weiterhin, die Verdünnung des Sekundäranalyten durch Diffusion aus dem Sensor durch geeignete Membranen zu unterbinden. Silikone

10 können chemisch so beschaffen sein, dass sie elektrisch isolierende und (gas-)permeable Eigenschaften vereinen.

Die bisher genannten Erfindungen weisen Membranen mit permeablen, aber nicht elektrisch isolierenden Eigenschaften auf.

15 Dagegen beschreiben die DE 69519698 T2 härtbare Silikonzusammensetzungen für Trennüberzüge, die jedoch nicht gaspermeabel sind, und in der DE 4118667 A1 ist ein Ableitelement für potentiometrische Messketten dargestellt, das aus gas- und

20 flüssigkeitsdichten Silikonklebern und Vergussmassen hergestellt wird. Bei den beiden letztgenannten Erfindungen ist die beschriebene Dichtung zwar elektrisch isolierend, aber nicht für Analyten permeabel.

25 Semipermeable Membranen in den bisher genannten Erfindungen können nicht zur dauerhaften elektrischen Isolierung einer Elektrolytlösung in Mikrokapillaren verwendet werden. Keine der aufgeführten Erfindungen vereint elektrisch isolierende mit semipermeablen Eigenschaften in einer Mikrosonde. Diese

30 Kombination ist jedoch zwingend notwendig, um mit hoch empfindlichen potentiometrischen Mikrosonden kleinste Analytkonzentrationen im Mikromaßstab zu messen, ohne dabei das die Sonde umgebende System zu stören oder zu verändern.

Zur Erzielung mechanisch stabiler Silikondichtungen muss ein ausreichender Vernetzungsgrad der Silikonbestandteile gewährleistet sein. In der Elektronik sind Silikone üblich, deren Vernetzung bei Raumtemperatur in Anwesenheit von Luftfeuchtigkeit abläuft (z.B. Dow Corning® RTV 3140). Deren Fließfähigkeit ist für ein Eindringen in trockene Mikrokapillaren ausreichend. Es ist jedoch auf Grund der hohen Grenzflächenspannung zwischen Silikon- und wässriger Phase technisch sehr schwierig, innerhalb sehr enger Mikrokapillaren eine entsprechende Grenzfläche aufzubauen, da dies energetisch ungünstig ist. Die wässrige Phase muss von innen mit Hilfe noch engerer Füllkapillaren direkt an die Dichtung gespritzt werden. Allein zum Ausstoßen des Wassers aus den Füllkapillaren ist ein hoher Injektionsdruck erforderlich. Der Energieaufwand steigt noch durch die aufzubauende hohe Grenzflächenspannung. Entsprechend dem energetisch günstigeren Zustand verbleibt oft Luft zwischen hydrophober und wässriger Phase. Ein anderer technischer Ansatz besteht darin, die Phasengrenze bereits an der Öffnung der Mikrokapillare aufzubauen, indem eine bereits mit Wasser gefüllte Mikrokapillare in ein geeignetes Silikonöl getaucht wird und im Inneren der Kapillare ein Unterdruck erzeugt wird. Nach dem bisherigen Stand der Technik sind allerdings keine bei Raumtemperatur vernetzenden Silikonformulierungen bekannt, deren Fließfähigkeit für eine ausreichende Zeitspanne groß genug ist, dass das Einsaugen in sehr feine wassergefüllte Mikrokapillaren gelingt. Eine Gas-Mikrosonde mit Silikondichtung, basierend auf einem handelsüblichen Silikonelastomer, wurde bereits von Hanstein et al. publiziert (S. Hanstein, D. de Beer and H. Felle, Sensors and Actuators 2001, B81, 107-114). Die dort vorgestellte Sonde besitzt eine Dichtung aus Silikonmasse für Dispersionsüberzüge, die in einem einstufigen Prozess hergestellt wurde. Gegenüber der hier vorliegenden erfindungsgemäßen Silikondichtung und dem erfindungsgemäßen Herstellungs-

verfahren ist die bereits publizierte Dichtung unvorteilhaft, denn die Vernetzungsreaktion der verwendeten Silikonmischung setzt bereits bei Kontakt mit der wässrigen Phase ein und erhöht somit die Viskosität des Silikons derart, dass nur
5 höchstens eine von vier Sensorspitzen erfolgreich abgedichtet werden kann. Eine weitere Miniaturisierung der Sonde ist mit dem bereits publizierten Verfahren unmöglich.

Das erfindungsgemäße zweistufige Herstellungsverfahren für
10 Silikondichtungen zeichnet sich gegenüber dem Stand der Technik dadurch aus, dass sie das Einziehen der Phasengrenze zwischen wässriger und hydrophober Phase in engen Mikrokapillaren entscheidend erleichtert bzw. bei sehr engen Mikrokapillaren erst ermöglicht. Bei dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren wird ein zu schnelles Auspolymerisieren der
15 flüssigen Silikonmasse vermieden. Die Länge der in der SONDENSPIITZE befindlichen Silikonphase lässt sich bei Bedarf nachträglich noch verringern. Entscheidende Vorteile des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens liegen darin begründet, dass es mit einem gegenüber dem Stand der Technik deutlich verminderten Fertigungsausschuss verbunden ist. Des weiteren weist die erfindungsgemäße Dichtung dadurch eine höhere Messempfindlichkeit auf, dass eine geringe Dicke der Silikondichtung effizienter erzielt werden kann. Die erhöhte
25 Messempfindlichkeit bedingt bei niedrigeren Analytkonzentrationen besser reproduzierbare Messergebnisse. Die erfindungsgemäße neuartige Silikondichtung erfüllt die Voraussetzungen, dass der interne Stromkreis des Sensors elektrisch von der Analyseflüssigkeit bzw. dem Analyseobjekt isoliert wird und
30 gleichzeitig eine hohe Permeabilität für die zu analysierende Substanz gewährleistet ist.

Aufgabe der Erfindung ist es, Dichtungen für Mikrosonden bereitzustellen, wobei diese Dichtungen die bekannten Nachteile des Standes der Technik ausschalten. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch Dichtungen, die eine hohe
5 Permeabilität für den zu messenden Analyten aufweisen, elektrisch isolierende Eigenschaften aufweisen und in Mikrosonden realisiert werden können. Bevorzugt bestehen diese Dichtungen aus einem nicht vernetzenden Silikon geringer Viskosität und einem vernetzenden Silikon.

10

Die erfindungsgemäße Dichtung findet Anwendung in Mikrosonden, mit deren Hilfe Substanzen im Mikromaßstab analysiert werden können, die durch das jeweilige Silikon permeieren können. Die Erfindung gestattet die Konstruktion sehr kleiner, hoch empfindlicher und selektiver Sensoren, welche den
15 Stoffwechsel biologischer Proben nicht beeinträchtigen oder verändern. Sie ist geeignet für Mikrosonden, die im zellbiologischen Bereich zum Einsatz kommen, z.B. zur Messung der Konzentration von CO_2 und O_2 als Steuergrößen des zellulären Energiestoffwechsels und der zellulären Stoffaufnahme oder zur Messung der Bildung von CO_2 und NH_3 in Infektionsherden an Wirtszellen oder an mikrobiellen Pathogenen.

Durch Dotieren des Elektrolyten hinter der Silikondichtung mit einem geeigneten Enzym ist es möglich, einen bestimmten
25 Primäranalyten aus einer biologischen Probe selektiv zu einem Sekundäranalyten umzusetzen. Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Silikondichtung in einer Sonde in Kombination mit der Enzymdotierung des Elektrolyten und einer geeigneten Messelektrode ist es möglich, den Sekundäranalyten amperometrisch
30 oder potentiometrisch zu messen.

Konstruktionsbedingt eignet sich die Dichtung besonders für Sonden, mit denen beispielsweise Kohlendioxid an einzelnen Stomata (Spaltöffnungen) von Pflanzenblättern als Steuergröße

von Öffnungs- und Schließbewegungen der Stomata gemessen werden kann.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur
5 Herstellung von Dichtungen bereitzustellen, die für Analyten permeabel, elektrisch isolierend und in Mikrosonden realisierbar sind.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren, eine Silikondichtung in zwei Stufen herzustellen. Dabei
10 wird im ersten Schritt ein nicht vernetzendes Silikonöl mit niedriger Viskosität in die Spitze einer Mikrosonde eingebracht. Die niedrige Viskosität erlaubt ein Einsaugen durch feine Sondenspitzen, beispielsweise durch 2 µm enge Glas-Mikropipetten. Das Einsaugen geschieht mit Hilfe eines Adap-
15 ters. Im zweiten Schritt wird dieses nicht vernetzende Silikonöl mit einem vernetzenden Silikon in Kontakt gebracht, so dass die Vernetzung erst dann eintritt, wenn sich das Silikon in der korrekten Position innerhalb der Sondenspitze befindet. Die niedrige Viskosität des nicht vernetzenden Silikon-
20 öls ist Voraussetzung für die Platzierbarkeit des Gemisches aus beiden Silikonölen innerhalb der Spitze der Glas-Mikropipette. Die Vermischung der beiden Silikonöle im Mikromaßstab wird durch die Diffusionsbewegung der Silikonmoleküle geleistet.

25

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung einer Mikrosonde unter Verwendung der erfindungsgemäßen Dichtung bereitzustellen. Dieses Verfahren wird erfindungsgemäß gelöst, indem zunächst (wie oben beschrieben)
30 eine erfindungsgemäße Dichtung in einer Glas-Mikropipette hergestellt wird. Unmittelbar danach wird von hinten eine enzymhaltige Lösung in die erste Glas-Mikropipette eingebracht; anschließend härtet die frisch hergestellte Dichtung aus. Danach wird eine zweite Glas-Mikropipette mit einer

Lösung aus einem Protonen-sensitiven Cocktail und PVC in THF befüllt. Durch Verdampfen des Lösungsmittels THF bildet sich ein festes PVC-Gel. Das feste PVC-Gel wird zunächst mit unverdünntem Protonen-sensitivem Cocktail und dann mit einem
5 Referenzpuffer überschichtet. Zuletzt wird eine Arbeitselektrode eingesetzt. Die erste Glas-Mikropipette mit der erfindungsgemäßen Silikondichtung wird mit einer Elektrode bestückt (Referenzelektrode), die in die Enzymlösung hineinragt. Danach wird die wie beschrieben vorbereitete zweite
10 Glas-Mikropipette so in die Spitze der erste Glas-Mikropipette geschoben, dass die zweite, innere Mikropipette an ihrem dieser Spitze abgewandten Ende um etwa 2,5 cm über die erste, äußere Mikropipette hinausragt. Die beiden Mikropipetten werden mit einem Kleber aneinander befestigt. Das
15 herausragende Ende der zweiten Glas-Mikropipette wird mit einem konventionellen Elektrodenhalter verbunden.

Der Stand der Technik kennt zahlreiche Verfahren, um permeable Membranen, Dichtungen und Isolatorschichten aus silikonhaltigem Material herzustellen. Die dem Fachmann bekannten
20 Verfahren sind jedoch nicht geeignet, eine wässrige Phase elektrisch dichtend innerhalb einer Mikrosonde zu überschichten, deren Spitzendurchmesser in der Größenordnung von 2 µm oder darunter liegt.

25 Die erfindungsgemäße Dichtung zeichnet sich dadurch aus, dass sie den zu bestimmenden Analyten einerseits elektrisch isolieren, andererseits jedoch eine hohe Permeabilität für diesen Analyten aufweisen, so dass der Analyt rasch durch die Membran hindurch zum eigentlichen Messbereich einer die
30 Dichtung enthaltenden Sonde gelangen kann.

Zur Herstellung von erfindungsgemäßen Silikondichtungen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird ein nicht vernetzendes Silikonöl 1 in die Behälter-Kapillare 6 eingefüllt (siehe Fig. 1) und diese waagrecht unter dem Objektiv 2 eines

Mikroskops montiert. Die abzudichtende Glas-Mikropipette 4 wird mit destilliertem Wasser 3 gefüllt und in die Kapillare 6 eingeführt. Am anderen Ende des Glases 5 wird der Adapterkopf 12 aufgesetzt (siehe Fig. 3), an dessen Ende sich eine 50 ml-Spritze 17 befindet. Die Gummidichtung 11 wird mit Hilfe der Dichtungsschraube 12 am Ende 5 der Glas-Mikropipette befestigt. Anschließend wird die Adaptervorrichtung am Metallrohr 13 in einem Mikromanipulator eingespannt. Das Metallrohr 13 ist über einen Kunststoffschlauch 14 und einen Dreiwegehahn 15 mit einer 50 ml Spritze 17 mit Luerlock-Anschluss verbunden. Durch Schließen des Dreiwegehahns 15 und Kolbenhub der Spritze 17 wird ein Unterdruck erzeugt und unter mikroskopischer Kontrolle nicht vernetzendes Silikon 1 in die Glas-Mikropipette 4 eingesaugt. Da die Grenzflächen-spannung zwischen Silikonphase und wässriger Phase in der Spitze 4 überwunden werden muss, geschieht dies ruckartig. Dabei wird die notwendige scharfe Phasengrenze ohne Ausbuchtungen nur dann erzielt, wenn die wässrige Phase proteinfrei ist. Überschüssiges Silikon wird in zwei Schritten aus der Spitze herausgedrückt: Zuerst wird der Spritzenkolben so weit gesenkt, bis der Stopfen maximal fünf Mal so lang ist, wie er in der endgültigen Dichtung sein soll. Anschließend werden Glas-Mikropipette 4, Adapter und Spritze aus der Behälter-Kapillare 6 entfernt. Die Verkürzung des Stopfens auf die endgültige Länge der Dichtung wird durch Senken des Spritzenkolbens vorgenommen, wobei überschüssiges 1 abläuft. Alternativ zu dem hier beschriebenen Einsaugverfahren kann durch Zusatz oberflächenaktiver Substanzen (z.B. nichtionische Tenside) zum Wasser die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und Silikon herabgesetzt werden, so dass ein überschussfreies Einsaugen des Silikons in die Spitze möglich ist. Das vernetzende Silikonöl 8 wird auf den Halter 7 aufgetragen und in Kontakt mit der Glas-Mikropipette 4 gebracht, die mit nicht vernetzendem Silikonöl befüllt ist (siehe Fig. 2). Der

Halter mit 8 wird auf die Spitze 4 zugeführt, und 8 wirkt zwei Mal vorzugsweise 45 Sekunden auf das nicht vernetzende Silikonöl 3 ein. Die Unterbrechung der Einwirkung verhindert die Haftung des vernetzenden Silikonöls an der Außenseite der Glas-Mikropipette bzw. das Herausziehen des nicht vernetzen-
5 Silikonöls beim Entfernen des Tropfens aus vernetzendem Silikonöl. Die Glas-Mikropipette darf nicht weiter als 10 µm in das vernetzende Silikonöl hinein ragen, da sonst der Sondendurchmesser durch außen anhaftendes vernetzendes Silikonöl erhöht wird. Nach Herausziehen der Glas-Mikropipette 4 aus dem nicht vernetzenden Silikon 8 wird die Füllkapillare 9 mit enzymhaltigem Elektrolyt 18 von hinten in die Glas-Mikropipette 4 eingebracht. Anschließend härtet die Dichtung für etwa 2-6 Stunden bei Raumtemperatur aus. Alternativ kann
10 das Aushärten auch bei 40-80 °C in Anwesenheit von Feuchtigkeit erfolgen, was den Aushärteprozess um einige Stunden beschleunigt. Besonders bevorzugt sind Aushärtezeiten von 4 Stunden bei Raumtemperatur bzw. 1 Stunde bei etwa 60 °C und feuchter Wärme.

20

Das Enzym 18 in der Füllkapillare 9 dient dazu, einen Primäranalyten quantitativ und stöchiometrisch in einen Sekundäranalyten umzusetzen, welcher anschließend gemessen wird. Ein besonders geeignetes Enzym ist beispielsweise Carboanhydrase
25 (CO₂).

Das Enzym kann mit geeigneten Oxidationsschutzmitteln stabilisiert werden. Geeignete Oxidationsschutzmittel sind beispielsweise Ascorbinsäure, Glutathion, Rosmarinsäure, Benzoesäure, Catechine.

30 Als Transducer zur Messung der Konzentration von Primär- oder Sekundäranalyt hinter der Silikondichtung kommen potentiometrische (pH, NH₄⁺) oder amperometrische Mikrosonden zum Einsatz (vgl. S. Hanstein, D. de Beer and H. Felle, Sensors and Actuators 2001, B81, 107-114). Sie werden von dem Ende her,

das nicht mit der Dichtung versehen ist, in die Glas-Mikropipette 4 geschoben.

- 5 Die erfindungsgemäße Mikrosonde zeichnet sich dadurch aus, dass sie die Vorteile der erfindungsgemäßen Dichtung in einer Anordnung realisiert, die so klein ist, dass sie für die Messung kleinster Analytmengen und / oder für Messungen auf kleinstem Raum verwendet werden kann.
- 10 Die Herstellung der erfindungsgemäßen Mikrosonde ist eine technische Weiterentwicklung einer in der Literatur beschriebenen Mikrosonde (vgl. S. Hanstein, D. de Beer and H. Felle, *Sensors and Actuators 2001, B81, 107-114*).
- Zur Herstellung von erfindungsgemäßen Mikrosonden wird zunächst eine erfindungsgemäße Dichtung wie beschrieben hergestellt. Anschließend wird ein Protonen-sensitiver Cocktail in PVC / THF gelöst und in eine zweite Glas-Mikropipette (23) eingefüllt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels bildet sich ein festes PVC-Gel. Das feste PVC-Gel wird zunächst mit
- 15 unverdünntem Protonen-sensitivem Cocktail 24 und dann mit einem geeigneten Referenzpuffer überschichtet. Die zweite Glas-Mikropipette 23, der Protonen-sensitive Cocktail 24 und der Referenzpuffer bilden gemeinsam mit einer einzubauenden Arbeitselektrode die pH-sensitive Mikroelektrode 20. Vorteil-
- 20 haft wird hierfür ein konventioneller Elektrodenhalter verwendet, in den eine Elektrode integriert ist und der es gestattet, die pH-sensitive Mikroelektrode mit einer weiteren Elektrode zu verbinden. Die in den Elektrodenhalter integrierte Elektrode enthält ein Metall und dessen Salz, bevorzugt ein Edelmetall und ein Edelmetallsalz.
- 30 In die erste Glas-Mikropipette 4 wird eine Referenzelektrode 21 geschoben. Danach wird die pH-sensitive Mikroelektrode 20 in die erste Glas-Mikropipette 4 geschoben und so nahe wie möglich an der Silikondichtung 22 platziert, etwa 20 µm von

der Spitzenöffnung entfernt. Die beiden Glas-Mikropipetten werden sofort mit Kleber 19 aneinander befestigt, wobei etwa 2,5 cm des der Dichtung abwandten Endes der pH-sensitiven Mikroelektrode 20 frei bleiben. Dieses Ende 25 wird in einen konventionellen Elektrodenhalter eingeführt.

Ausführungsbeispiele

10 1. Verfahren zur Herstellung der Dichtung

Als nicht vernetzendes Silikonöl wurde Dow Corning Produkt 200 (R) Fluid mit einer Viskosität von 0,1 Stokes (25 °C) und einer Aktivität von 100 % eingesetzt. Die verwendete Behälterkapillare hatte einen Innendurchmesser von 2 mm. Die abzudichtende Glas-Mikropipette wurde vor Herstellung der Dichtung mit 1 µm sterilem destilliertem Wasser gefüllt. Als vernetzendes Silikonöl diente Dow Corning Produkt (R) 1340 RTV Coating.

20 Alternativ können als vernetzendes Silikonöl auch Gemische aus einem Silanol mit einer Viskosität von 50-120 cSt, z.B. Dow Corning Produkt DC 2-1273, oder einem Silanol mit einer Viskosität von 2.000 cSt, z.B. Dow Corning Produkt DC 3-0133, jeweils gemischt mit 5-10 Gew.-% Methyltrimethoxysiloxan, 25 eingesetzt werden.

2. Verfahren zur Benutzung der Dichtung in einer Mikrosonde und Herstellung der Mikrosonde

30 Die Dichtung und die Mikrosonde werden wie oben beschrieben hergestellt. Glas-Mikropipette 4 und Füllkapillare mit Enzymelektrolyt 9 bestehen aus Glas, vorzugsweise Borosilikatglas (z.B. von Fa. Hilgenberg GmbH, Malsdorf, Deutschland) und werden vor Herstellung der Dichtung mit einer Lösung von 0,2%

Tributylchlorsilan in Chloroform nach dem Fachmann bekannten Verfahren silanisiert.

- Um die Dichtung in einem Sensor zur CO₂-Messung zu verwenden, wird in die Füllkapillare 9 eine Carboanhydrase-Lösung einge-
- 5 füllt. Hierzu werden zunächst eine 1%-ige Stocklösung von Chloramphenicol in Ethanol und eine Pufferlösung aus 1 mM NaHCO₃ und 100 mM NaCl (pH 8,3) hergestellt. Die Enzymlösung wird anschließend aus 0,4 ml der beschriebenen NaHCO₃-
- 10 Pufferlösung, 3 mg lyophilisierter Carboanhydrase und 2 µl Chloramphenicol-Stocklösung angesetzt und sofort für die Befüllung der Füllkapillare verwendet. Die Carboanhydraselösung wurde vor dem Einfüllen mit einem Oxidationsmittel stabilisiert, bevorzugt mit 5 mM Ascorbinsäure.
- 15 Um die Dichtung in einem CO₂-Mikrosensor zu verwenden, wird eine weitere Glas-Mikropipette (Außendurchmesser 1 mm, Innendurchmesser 0,6 mm) aus Borosilikatglas wie oben beschrieben silanisiert. Ein dem Fachmann bekannter Protonen-sensitiver hydrophober Cocktail, bevorzugt Fluka Produkt #95297, Hydro-
- 20 gen ionophore II-Cocktail A, Selectophore[®], wird in einem Gemisch aus 40 mg PVC / ml THF im Verhältnis 30:70 (V/V) gelöst. Diese (hydrophobe) Lösung wird mit Hilfe einer Füllkapillare von hinten in die zweite Glas-Mikropipette eingefüllt. Durch die Verwendung einer silanisierten Glas-
- 25 Mikropipette sammelt sich die (hydrophobe) Lösung in der Spitze der Glas-Mikropipette, ohne aus dieser hinauszulaufen. Das THF wird im Vakuum abgezogen, wodurch sich ein festes PVC-Gel bildet. Das feste PVC-Gel wird zunächst mit unverdünntem Protonen-sensitivem Cocktail überschichtet, anschließend
- 30 mit Referenzpuffer. Referenzpuffer: 100 mM 2-[N-Morpholino-]ethansulfonsäure wird mit einer Lösung von 100 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan auf pH 8,3 eingestellt, dann werden 100 mM KCl hinzugefügt.

Als Referenzelektrode (Einbau in die erste Glas-Mikropipette) wird eine Silber-Silberchlorid-Elektrode verwendet. Herstellung: Ca. 1 mm der Teflonbeschichtung eines Teflonbeschichteten Silberdrahtes werden abgelöst und die blanke
5 Silberspitze 3 Minuten bei 300 μ A in einer 3M KCl-Lösung chloridiert.

Der Zusammenbau erfolgte wie beschrieben. Die beiden Glas-Mikropipetten werden sofort mit Kleber, vorzugsweise einem handelsüblichen Cyanacrylatkleber (z.B. Tesa[®] Sekundenkleber,
10 Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland) aneinander befestigt. Das freie, der Silikondichtung abgewandte Ende der zweiten Glas-Mikropipette wird anschließend in einen konventionellen Elektrodenhalter eingeführt. Dieser Elektrodenhalter enthält ein in Kunststoff gefasstes Ag-AgCl-Plättchen, das als Referenzelektrode dient.
15

Derjenige Bereich der äußeren Glas-Mikropipette, in dem sich die chloridierte Spitze der Silberelektrode befindet, wird mit einem 5 mm breiten Ring aus Acrylfarbe versehen, da das
20 elektrische Potential an der Ag/AgCl-Elektrode lichtsensitiv ist.

Bezugszeichenliste

Im Folgenden sind 5 Zeichnungen aufgeführt.

- 5 1. nicht vernetzendes Silikon
- 2. Objektiv des Mikroskops
- 3. destilliertes Wasser
- 4. erste Glas-Mikropipette (äußere Pipette)
- 5. Stelle zum Ansetzen des Adapters
- 10 6. Behälter-Kapillare
- 7. Halter
- 8. vernetzendes Silikon
- 9. Füllkapillare mit Enzymelektrolyt
- 10. Dichtungsschraube
- 15 11. Gummidichtung
- 12. Adapterkopf
- 13. Metallrohr zum Einspannen des Adapters in Mikromanipulator
- 14. Kunststoffschlauch (nur Anfang und Ende eingezeichnet)
- 20 15. Dreiwegehahn
- 16. Luerlock-Anschluss
- 17. Spritze (50 ml)
- 18. Enzymelektrolyt
- 19. Kleber
- 25 20. pH-sensitive Mikroelektrode
- 21. Referenzelektrode
- 22. Silikondichtung
- 23. zweite Glas-Mikropipette (innere Pipette)
- 24. Protonen-sensitiver Cocktail
- 30 25. Stelle zum Ansetzen des Elektrodenhalters

Figure 1:

Schematische Darstellung der Einbringung des nicht vernetzen-
den Silikonöls (1) in die Glas-Mikropipette (4) unter mikro-
skopischer Kontrolle (2). Die Spitze der Glas-Mikropipette
5 (4) ist mit destilliertem Wasser (3) gefüllt. Der Adapter
wird am hinteren Ende (5) der Kapillare aufgesetzt. Die
wassergefüllte Glas-Mikropipette wird in die Kapillare (6)
mit dem Silikonöl (1) eingeführt. Durch Kolbenhub der Adap-
terspritze (s. Fig. 3) wird ein Unterdruck erzeugt und Sili-
10 konöl (1) in die Glas-Mikropipette (4) gesaugt.

Figure 2:

Schematische Darstellung des Einbringens des vernetzenden
Silikonöls (8). Das vernetzende Silikonöl (8) wird auf den
15 Halter (7) aufgetragen und mit der Glas-Mikropipette (4) in
Kontakt gebracht. Nach Herausziehen der Glas-Mikropipette (4)
aus dem nicht vernetzenden Silikonöl (8) wird die Füllkapil-
lare mit enzymhaltigem Elektrolyt (9) von hinten in die Glas-
Mikropipette (4) eingebracht.

20

Figure 3:

Darstellung im Querschnitt: Adapter zum Einsaugen von nicht
vernetzendem Silikonöl (1) in die Spitze einer Glas-
Mikropipette (4). Der Adapter besteht aus Dichtungsschraube
25 (10), Gummidichtung (11), Adapterkopf (12), einem Metallrohr
(13) zum Einspannen des Adapters in den Mikromanipulator und
einem Kunststoffschlauch (14).

Figure 4:

30 Schematische Darstellung der fertigen Mikrosonde: Die Mikro-
sonde besteht aus zwei konzentrischen, ineinander geschobenen
Glas-Mikropipetten (4 und 23), die mit einem Kleber (19)
aneinander befestigt sind. Die innere Glas-Mikropipette (23)
enthält einen mit Referenzpuffer überschichteten Protonen-

sensitiven Cocktail (24). Innere Glas-Mikropipette, mit Referenzpuffer überschichteter Protonen-sensitiver Cocktail und Arbeitselektrode bilden gemeinsam die pH-sensitive Mikroelektrode (20). Dabei wird als Arbeitselektrode bevorzugt
5 eine solche Elektrode verwendet, die in einen konventionellen Elektrodenhalter integriert ist. Die pH-sensitive Mikroelektrode (20) wird in der Spitze der äußeren Glas-Mikropipette (4) positioniert. Die Spitze der pH-sensitiven Mikroelektrode (20) befindet sich dabei etwa 20 µm hinter der Spitze der
10 äußeren Glas-Mikropipette (4), die mit einer nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Silikondichtung (22) verschlossen ist. Der Raum zwischen äußerer Glas-Mikropipette (4) und pH-sensitiver Mikroelektrode (20) ist mit einer Enzymlösung (18) gefüllt. Eine Referenzelektrode (21) verbindet die Enzymlösung mit der Erdung. Das hintere Ende (25) der
15 pH-sensitiven Mikroelektrode wird mit einem konventionellen Elektrodenhalter verbunden.

Figure 5:

20 Schematische Darstellung der Spitze der fertigen Mikrosonde:
In der Spitze der äußeren, ersten Glas-Mikropipette (4) befindet sich die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Silikondichtung (22). Der Raum hinter dieser Silikondichtung (22) ist mit Enzymelektrolyt (18) gefüllt. Die
25 Spitze der zweiten Glas-Mikropipette (23) wird in die Spitze der ersten Glas-Mikropipette (4) geschoben. In der Spitze der zweiten Glas-Mikropipette (23) befindet sich ein Protonen-selektiver Cocktail (24).

Patentansprüche

1. Dichtung für Sonden zur Messung von Gaskonzentrationen,
dadurch gekennzeichnet, dass sie aus einer Mischung von
5 Silikon-Polymeren besteht, die permeabel für Gasmoleküle
ist.
2. Verfahren zur Herstellung einer Dichtung innerhalb einer
Glas-Mikropipette, vorzugsweise in der Spitze einer Glas-
10 Mikropipette, im Besonderen einer Silikondichtung für
Mikrosonden zur Messung von Gaskonzentrationen, gekenn-
zeichnet durch folgende Schritte:
 1. Einsaugen eines nicht vernetzenden Silikonöls in
eine flüssigkeitsgefüllte, bevorzugt mit Wasser ge-
15 füllte Glas-Mikropipette.
 2. Herausdrücken überschüssigen nicht vernetzenden Si-
likonöls.
 3. Eintauchen der Spitze der Glas-Mikropipette in ei-
nen Tropfen vernetzenden Silikonöls
 - 20 4. Spitze der Glas-Mikropipette für mindestens 5 Se-
kunden im vernetzenden Silikonöl belassen.
 5. Glas-Mikropipette aus dem vernetzenden Silikonöl
herausziehen.
 6. Schritte 3 bis 5 bis zum Erreichen des gewünschten
25 Vernetzungsgrades wiederholen.
 7. Aushärten der Silikondichtung.
3. Verfahren zur Herstellung einer Dichtung für Mikrosonden,
bevorzugt einer Silikondichtung für Mikrosonden zur Mes-
30 sung von Gaskonzentrationen, gemäß Anspruch 2, dadurch
gekennzeichnet, dass die Glas-Mikropipette aus Borosili-
kat, Aluminiumsilikat oder Quarzglas besteht.

4. Verfahren zur Herstellung einer Dichtung für Mikrosonden, bevorzugt eine Silikondichtung für Mikrosonden zur Messung von Gaskonzentrationen, gemäß Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichtung einen Innendurchmesser kleiner oder gleich 12 μm , bevorzugt zwischen 0,5 μm und 2 μm , ganz besonders bevorzugt zwischen 1,75 und 2 μm besitzt.
5. Verfahren zur Herstellung einer Dichtung für Mikrosonden, bevorzugt eine Silikondichtung für Mikrosonden zur Messung von Gaskonzentrationen, gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichtung eine Länge kleiner oder gleich 50 μm , bevorzugt zwischen 5 μm und 20 μm , ganz besonders bevorzugt zwischen 8 μm und 12 μm besitzt.
6. Verfahren zur Herstellung einer Dichtung für Mikrosonden, bevorzugt einer Silikondichtung für Mikrosonden zur Messung von Gaskonzentrationen, gemäß einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das verwendete Silikon elektrische Isolatoreigenschaften besitzt.
7. Verfahren zur Herstellung einer Dichtung für Mikrosonden, bevorzugt einer Silikondichtung für Mikrosonden zur Messung von Gaskonzentrationen, gemäß einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Spitze der Glas-Mikropipette einen Innendurchmesser kleiner oder gleich 4 μm besitzt.
8. Verfahren zur Herstellung einer Dichtung für Mikrosonden, bevorzugt einer Silikondichtung für Mikrosonden zur Messung von Gaskonzentrationen, gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Glas-Mikropipette vor dem Einsaugen des nicht vernetzenden Silikonöls mit Wasser

befüllt wird, dem eine oberflächenaktive Substanz, bevorzugt ein nichtionisches Tensid, zugesetzt wurde und dass im Falle des Zusetzens der oberflächenaktiven Substanz das Herausdrücken überschüssigen nicht vernetzenden Silikonöls gemäß den Verfahrensschritten 2 und 3 nach Anspruch 2 entfällt.

9. Verfahren zur Herstellung einer Dichtung für Mikrosonden, bevorzugt einer Silikondichtung für Mikrosonden zur Messung von Gaskonzentrationen, gemäß einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Glas-Mikropipette vor Herstellung der Dichtung silanisiert wird.

10. Verfahren zur Herstellung einer Dichtung für Mikrosonden, bevorzugt einer Silikondichtung für Mikrosonden zur Messung von Gaskonzentrationen, gemäß einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem nicht vernetzenden Silikonöl um ein nicht vernetzendes Silikonöl mit Trimethyl-Siloxy-Endgruppen handelt, bevorzugt um ein nicht vernetzendes Polydimethylsiloxan mit Trimethyl-Siloxy-Endgruppen, besonders bevorzugt um ein nicht vernetzendes Polydimethylsiloxan mit Trimethyl-Siloxy-Endgruppen und einer Viskosität zwischen 0,02 und 0,5 Stokes, ganz besonders bevorzugt um ein nicht vernetzendes Polydimethylsiloxan mit Trimethyl-Siloxy-Endgruppen und einer Viskosität zwischen 0,05 und 0,1 Stokes.

11. Verfahren zur Herstellung einer Dichtung für Mikrosonden, bevorzugt einer Silikondichtung für Mikrosonden zur Messung von Gaskonzentrationen, gemäß einem der Ansprüche 2 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem vernetzenden Silikon um ein Gemisch aus Dimethylsiloxan mit endständigen Hydroxylgruppen und Trimethylsiloxan sowie einem Vernetzer handelt, bevorzugt um ein vernetzendes

- RTV-Silikonölgemisch aus Dimethylsiloxan mit endständigen Hydroxylgruppen und Trimethylsiloxan sowie einem Vernetzer, besonders bevorzugt um ein vernetzendes RTV-Silikonölgemisch aus Dimethylsiloxan mit endständigen Hydroxylgruppen und Trimethylsiloxan sowie 5-10 % Methyltrimethoxysiloxan als Vernetzer, ganz besonders bevorzugt um ein vernetzendes RTV-Silikonölgemisch aus Dimethylsiloxan mit endständigen Hydroxylgruppen und Trimethylsiloxan sowie 5-10 % Methyltrimethoxysiloxan als Vernetzer, wobei das vernetzende RTV-Silikonölgemisch aus Dimethylsiloxan mit endständigen Hydroxylgruppen und Trimethylsiloxan sowie 5-10 % Methyltrimethoxysiloxan als Vernetzer eine Viskosität kleiner oder gleich 28.000 cSt besitzt.
12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Silikondichtung für 2 bis 6 Stunden bei Raumtemperatur ausgehärtet wird, bevorzugt, besonders bevorzugt für 3 bis 5 Stunden bei Raumtemperatur, ganz besonders bevorzugt für 4 Stunden bei Raumtemperatur.
13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Silikondichtung in feuchter Wärme bei 40-80 °C ausgehärtet wird, bevorzugt für 0,5-4 Stunden bei 50-70 °C, besonders bevorzugt für 45-75 min bei 55-65 °C.
14. Verfahren zur Herstellung einer Mikrosonde zur Messung von Gaskonzentrationen unter Verwendung einer Dichtung gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet durch folgende Schritte:
1. Herstellung der Dichtung gemäß einem der Ansprüche 2 bis 13, wobei die Glas-Mikropipette nach dem Herausziehen aus dem vernetzenden Silikonöl gemäß Verfah-

- rensschritt 5 nach Anspruch 2 im Falle des Erreichens des gewünschten Vernetzungsgrades gemäß Verfahrensschritt 6 nach Anspruch 2 zunächst mit einer Enzymlösung dotiert wird und die Dichtung anschließend gemäß
- 5 Verfahrensschritt 7 nach Anspruch 2 ausgehärtet wird
2. Befüllen einer zweiten Glas-Mikropipette mit einer Lösung aus einem Protonen-sensitiven Cocktail und einem flüssigem Polymer, wobei das Befüllen von der der Spitze abgewandten Seite der Glas-Mikropipette erfolgt
- 10 3. Aushärten des Gemisches aus Protonen-sensitivem Cocktail und Polymer, so dass sich die Spitze der Pipette verschließt
4. Überschichten des ausgehärteten Gemisches mit Protonen-sensitivem Cocktail und einem Referenzpuffer
- 15 5. Einführen einer Arbeitselektrode in die zweite Glas-Mikropipette
6. Einführen einer Referenzelektrode in die erste Glas-Mikropipette
7. Spitze der zweiten Glas-Mikropipette unter Wahrung eines Abstandes zwischen der Spitze der zweiten Glas-Mikropipette und der Silikondichtung in die erste Glas-Mikropipette schieben
- 20 8. beide Glas-Mikropipetten durch Kleber aneinander befestigen
- 25 15. Verfahren zur Herstellung einer Mikrosonde zur Messung von Gaskonzentrationen gemäß Anspruch 14 unter Verwendung einer Dichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass auf den Einbau der Arbeitselektrode gemäß Verfahrensschritt 5 nach Anspruch 14 verzichtet wird und stattdessen nach der Befestigung der beiden Glas-Mikropipetten durch Kleber gemäß Verfahrensschritt 8 nach Anspruch 14 das hintere Ende der zweiten Glas-Mikropipette mit einem konventionellen Elektrodenhalter verbunden wird, wobei
- 30

der Elektrodenhalter eine Elektrode aus einem Metall und einem Salz dieses Metalls enthält.

16. Verfahren zur Herstellung einer Mikrosonde zur Messung
5 von Gaskonzentrationen gemäß Anspruch 15 unter Verwendung einer Dichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektrode aus einem Silber-Silberchlorid-Plättchen besteht, das in Kunststoff gefasst ist.
- 10 17. Verfahren zur Herstellung einer Mikrosonde zur Messung von Gaskonzentrationen gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Enzym um Carboanhydrase handelt.
- 15 18. Verfahren zur Herstellung einer Mikrosonde zur Messung von Gaskonzentrationen gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass dem Enzym ein Oxidationsschutz zugesetzt wird, bevorzugt ein Oxidationsschutz aus der Gruppe Ascorbinsäure, Glutathion, Catechine, Benzoessäure, Rosmarinsäure, besonders bevorzugt Ascorbinsäure.
20
19. Verfahren zur Herstellung einer Mikrosonde zur Messung von Gaskonzentrationen gemäß einem der Ansprüche 14 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Elektroden um nicht toxische Elektroden handelt, bevorzugt um Silber-Silberchlorid-Elektroden.
25
20. Verwendung einer Dichtung in einer Mikrosonde gemäß einem der Ansprüche 14 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die
30 Mikrosonde für Messungen von Gasen aus der Gruppe Kohlendioxid, Ammoniak und Sauerstoff, bevorzugt für die Messung von Kohlendioxid, verwendet wird.

21. Verwendung einer Dichtung in einer Mikrosonde gemäß einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikrosonde für Untersuchungen von biologischen Systemen eingesetzt wird.

5

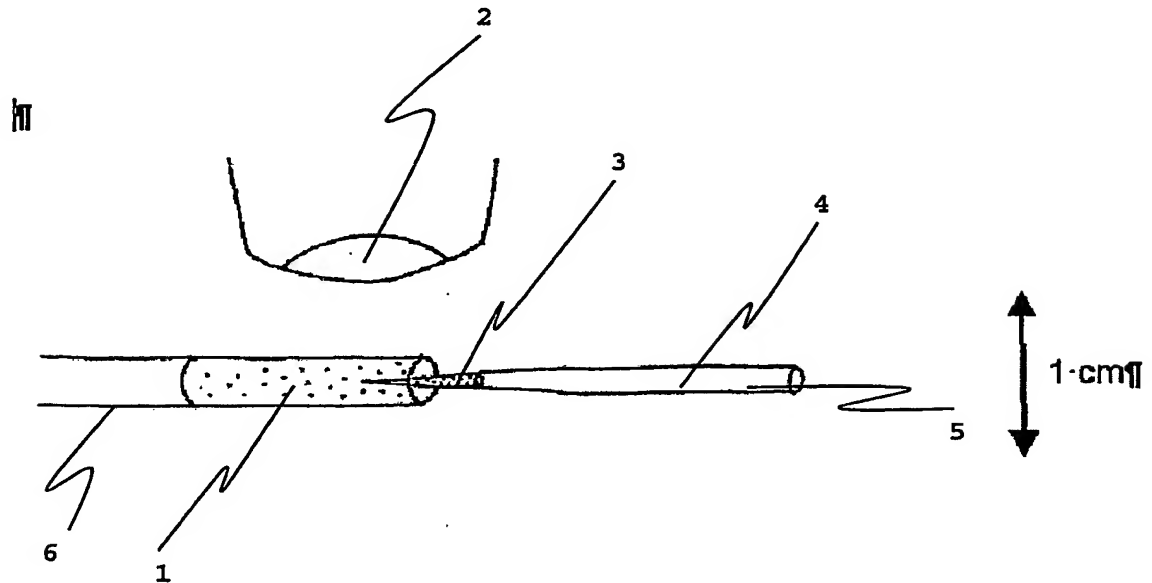
22. Verwendung einer Dichtung in einer Mikrosonde gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikrosonde für Untersuchungen von Gasen in phytophysiologischen Systemen eingesetzt wird, bevorzugt für die Messung der Zellatmung, besonders bevorzugt für die Messung von Kohlendioxid und/oder NH_3 in Pflanzenblättern, ganz besonders bevorzugt für hoch auflösende Kohlendioxid- und/oder NH_3 -Messungen an einzelnen Stomata von Pflanzenblättern.

15

Anhängende Zeichnungen

Anzahl anhängende Zeichnungen: 5

5 Figure 1:



20 Figure 2:

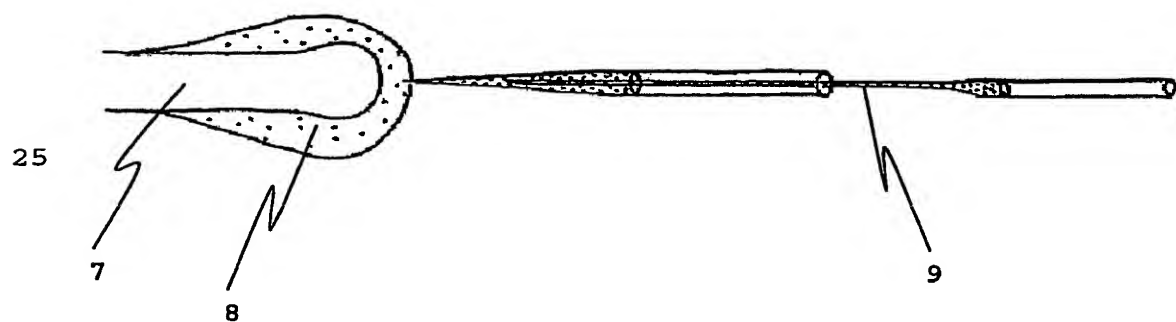


Figure 3:

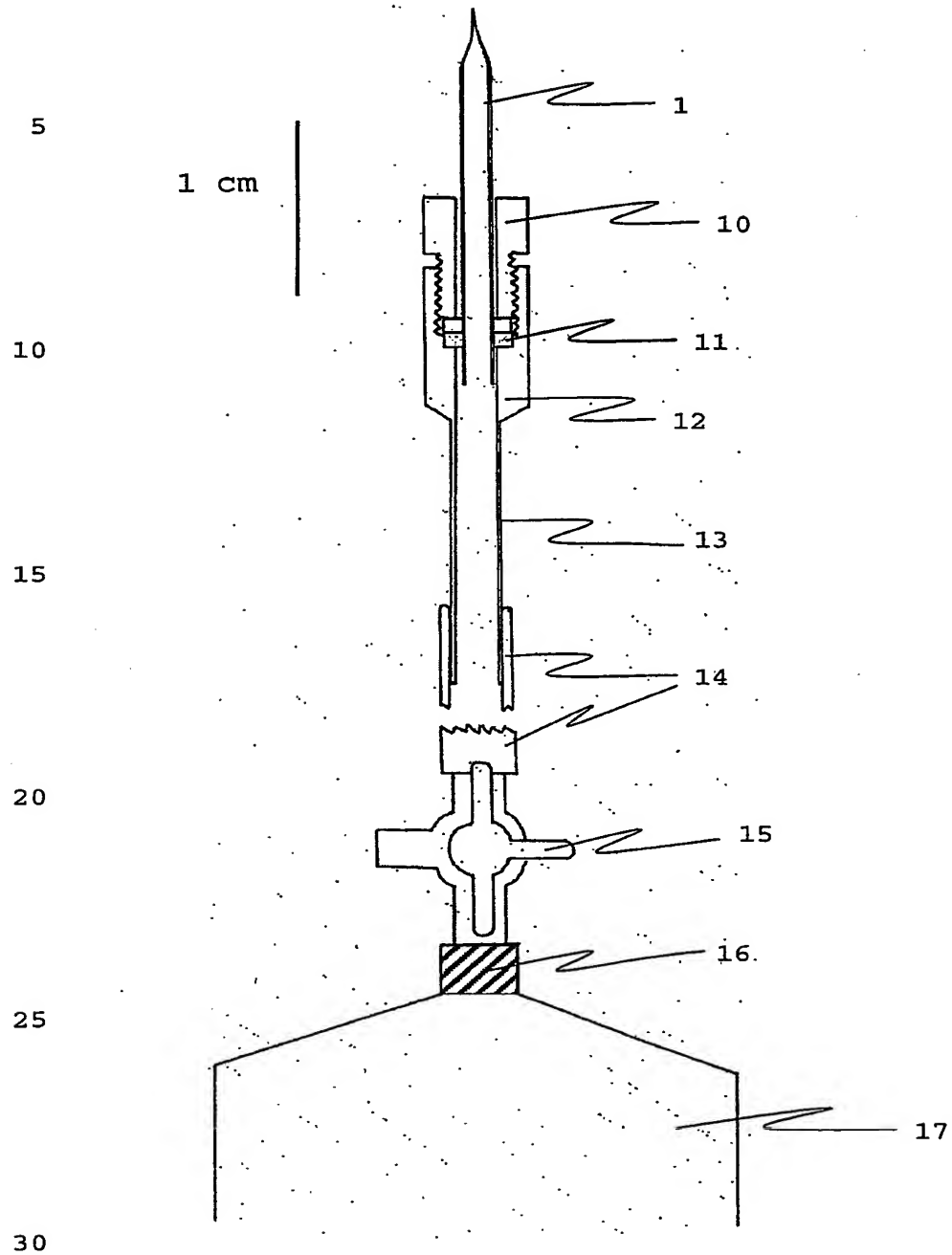


Figure 4:

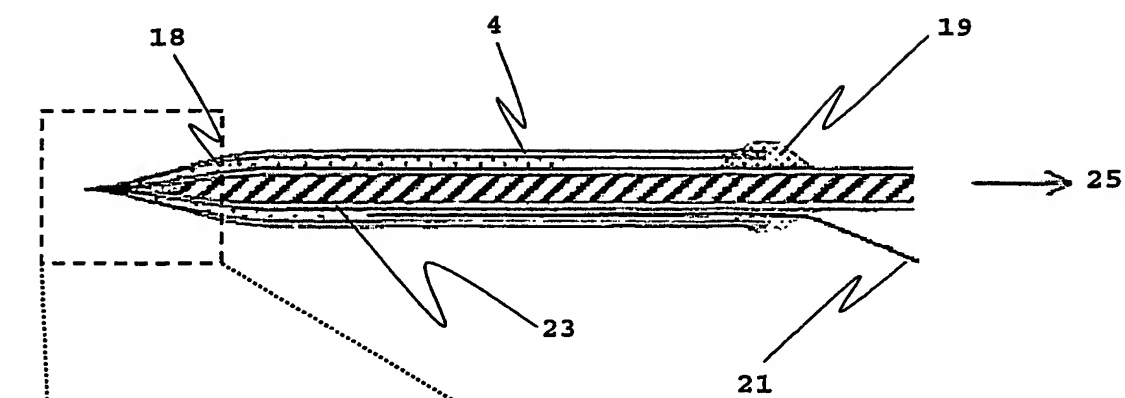
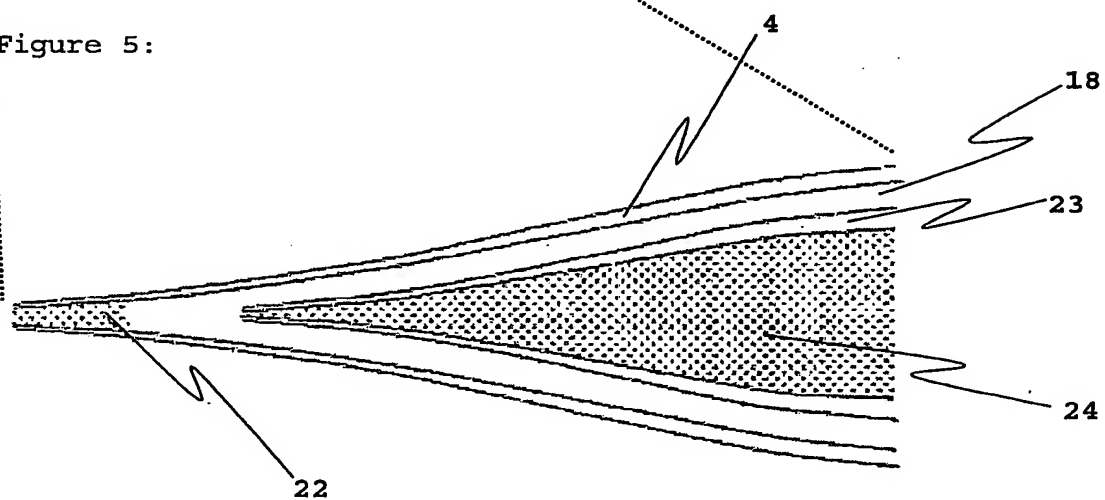


Figure 5:



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/02777

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N27/40 C12Q1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A A	US 5 102 526 A (BROWN R B ET AL) 7 April 1992 (1992-04-07) column 3, line 31 -column 6, line 55 HANSTEIN S ET AL: "Miniaturised carbon dioxide sensor designed for measurements within plant leaves" SENSORS AND ACTUATORS B, vol. 81, no. 1, 15 December 2001 (2001-12-15), pages 107-114, XP004324027 ISSN 0925-4005 cited in the application page 108, right-hand column, paragraph 2 -page 109, right-hand column, paragraph 1; figure 1 --- -/-	1,21 2,6, 10-14,22 1-7,9, 12,14-22

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 January 2004

Date of mailing of the international search report

04/02/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Johnson, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/02777

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>NL 8 602 668 A (SENTRON V O F) 16 May 1988 (1988-05-16)</p> <p>page 3, line 19 - line 32 page 5, line 32 -page 6, line 9; figure -& DATABASE WPI Section Ch, Week 8824 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A85, AN 1988-166268 XP002267578 & NL 8 602 668 A (...), 16 May 1988 (1988-05-16) abstract</p>	<p>1-7,9, 12-16, 19,21</p>
A	<p>EP 0 681 862 A (HOECHST) 15 November 1995 (1995-11-15) page 2, line 1 -page 4, line 49; example 3</p>	<p>1,2,5,6, 10-13</p>

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 03/02777

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5102526	A	07-04-1992	AU 645724 B2	20-01-1994
			AU 7791391 A	27-11-1991
			CA 2081915 A1	03-11-1991
			EP 0527188 A1	17-02-1993
			JP 5506932 T	07-10-1993
			WO 9117430 A1	14-11-1991
			US 5607566 A	04-03-1997
NL 8602668	A	16-05-1988	NONE	
EP 0681862	A	15-11-1995	DE 4416330 A1	16-11-1995
			EP 0681862 A2	15-11-1995
			JP 7304887 A	21-11-1995
			US 5733663 A	31-03-1998

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 03/02777

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5102526	A	07-04-1992	AU 645724 B2	20-01-1994
			AU 7791391 A	27-11-1991
			CA 2081915 A1	03-11-1991
			EP 0527188 A1	17-02-1993
			JP 5506932 T	07-10-1993
			WO 9117430 A1	14-11-1991
			US 5607566 A	04-03-1997
NL 8602668	A	16-05-1988	NONE	
EP 0681862	A	15-11-1995	DE 4416330 A1	16-11-1995
			EP 0681862 A2	15-11-1995
			JP 7304887 A	21-11-1995
			US 5733663 A	31-03-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/02777

A. KLASSTFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N27/40 C12Q1/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5' 102 526 A (BROWN R B ET AL) 7. April 1992 (1992-04-07)	1,21
A	Spalte 3, Zeile 31 -Spalte 6, Zeile 55	2,6, 10-14,22
A	HANSTEIN S ET AL: "Miniaturised carbon dioxide sensor designed for measurements within plant leaves" SENSORS AND ACTUATORS B, Bd. 81, Nr. 1, 15. Dezember 2001 (2001-12-15), Seiten 107-114, XP004324027 ISSN 0925-4005 in der Anmeldung erwähnt Seite 108, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 109, rechte Spalte, Absatz 1; Abbildung 1 -/-	1-7,9, 12,14-22

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Januar 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/02/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Johnson, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/02777

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	NL 8 602 668 A (SENTRON V O F) 16. Mai 1988 (1988-05-16)	1-7,9, 12-16, 19,21
	Seite 3, Zeile 19 - Zeile 32 Seite 5, Zeile 32 -Seite 6, Zeile 9; Abbildung -& DATABASE WPI Section Ch, Week 8824 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A85, AN 1988-166268 XP002267578 & NL 8 602 668 A (...), 16. Mai 1988 (1988-05-16) Zusammenfassung	
A	EP 0 681 862 A (HOECHST) 15. November 1995 (1995-11-15) Seite 2, Zeile 1 -Seite 4, Zeile 49; Beispiel 3	1,2,5,6, 10-13

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/DE 03/02777

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5102526	A	07-04-1992	AU 645724 B2	20-01-1994
			AU 7791391 A	27-11-1991
			CA 2081915 A1	03-11-1991
			EP 0527188 A1	17-02-1993
			JP 5506932 T	07-10-1993
			WO 9117430 A1	14-11-1991
			US 5607566 A	04-03-1997
NL 8602668	A	16-05-1988	KEINE	
EP 0681862	A	15-11-1995	DE 4416330 A1	16-11-1995
			EP 0681862 A2	15-11-1995
			JP 7304887 A	21-11-1995
			US 5733663 A	31-03-1998

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.